

ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIALLERGIC AGENT

Patent Number: JP4208222
Publication date: 1992-07-29
Inventor(s): NAKAJIMA KAORU; others: 03
Applicant(s): TSUMURA & CO
Requested Patent: ☐ JP4208222
Application Number: JP19900330524 19901130
Priority Number(s):
IPC Classification: A61K31/34 ; A61K35.78 , C07D307/42
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE: To obtain an anti-inflammatory and antiallergic agent containing a polyacetylenic compound as an active ingredient.

CONSTITUTION: The objective substance is obtained by including a compound, e.g. 2-[(1E, 7E)-1,7-nonadiene-3,5-diynyl]furan expressed by the formula (R is H, OH or acetoxy) as an active ingredient, further suitably blending other normally used pharmaceutical ingredients with the active ingredient and preparing a pharmaceutical according to a conventional method. The above-mentioned substance can be prepared into the form of an oral agent such as tablet, capsule, granule, fine granule or powder or a parenteral agent such as injection or suppository. The dose for an adult per day expressed in terms of the weight of the compound expressed by the formula is 50mg to 5g in the case of oral administration and 0.1mg to 1g in the case of parenteral administration. The compound expressed by the formula is obtained by extracting a herb medicine *Atractylodes Rhizoma* with a solvent (e.g. hexane) and then subjecting the resultant extract to chromatography.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

⑫ 公開特許公報(A)

平4-208222

⑮ Int. Cl.³

A 61 K 31/34

C 07 D 307/42

識別記号

A B E

A B F

T

庁内整理番号

7252-4C

7252-4C

7180-4C

7729-4C

⑬ 公開 平成4年(1992)7月29日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全6頁)

⑭ 発明の名称 抗炎症および抗アレルギー剤

⑯ 特 願 平2-330524

⑰ 出 願 平2(1990)11月30日

⑱ 発 明 者 中 島 薫 茨城県稲敷郡阿見町吉原3586 株式会社ツムラ内
 ⑱ 発 明 者 柳 沢 利 彦 茨城県稲敷郡阿見町吉原3586 株式会社ツムラ内
 ⑱ 発 明 者 飯 村 二 三 男 茨城県稲敷郡阿見町吉原3586 株式会社ツムラ内
 ⑱ 発 明 者 三 橋 博 茨城県稲敷郡阿見町吉原3586 株式会社ツムラ内
 ⑲ 出 願 人 株 式 会 社 ツ ム ラ 東京都中央区日本橋3丁目4番10号

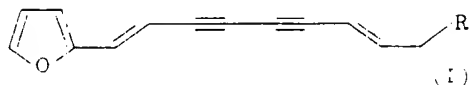
明 細 書

1. 発明の名称

抗炎症および抗アレルギー剤

2. 特許請求の範囲

(1)下記式 I



(I)

(式中、Rは水素原子、水酸基またはアセトキシ基である。)で示されるポリアセチレン系化合物を有効成分とする抗炎症および抗アレルギー剤。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明はポリアセチレン系化合物を有効成分とする抗炎症および抗アレルギー剤に関するものである。

[従来の技術および課題]

近年、我が国の公害問題や環境変化に伴い、気管支喘息や花粉症等のアレルギー性疾患の患者が

増加し、大きな社会問題になっており、抗アレルギー作用を有する薬物の開発が望まれていた。

また抗炎症作用を有する化合物の開発も同時に望まれていた。

[課題を解決するための手段]

本発明者等は、アレルギー性疾患の治療に有効な抗アレルギー作用を有する化合物および抗炎症作用を有する化合物を求めて、鋭意研究を重ねた結果、臨床的にも広く用いられている生薬蒼朮(Atractylodes lancea DE CANDOLLE)またはその他同属植物に含まれるポリアセチレン系化合物の中に抗炎症および抗アレルギー作用を有する化合物を見だし、本発明を完成するに至った。すなわち本発明は、以下に示すごとくである。

下記式



(I)

(式中、Rは水素原子、水酸基またはアセトキシル基である。)で示されるポリアセチレン系化合物(以下、式の化合物という)を有効成分とする抗炎症および抗アレルギー剤である。

式の化合物は、例えば次のような方法により得ることができる。

すなわち生薬膏等を、ヘキサン、ジエチルエーテル、石油エーテル、酢酸エチル、クロロホルム、アセトン、メタノール、エタノールより選ばれる少なくとも一つの溶媒で抽出し、得られた抽出液から溶媒を除去して得た残渣をヘキサン、ベンゼン、ジエチルエーテル、石油エーテル、酢酸エチル、クロロホルム、アセトン、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、メタノール、エタノール、水、より選ばれる少なくとも一つの溶媒を溶出溶媒として、ダイサイオンHP-20、MCIゲルCHP20Pなどのポーラスポリマー、セマテックスLH 20などのスターチゲル、逆相シリカゲル、シリカゲル、ポリアミドまたはセロコース等

を担体に用いたカラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーまたは高速液体クロマトグラフィーに1回または数回付すことにより、式の化合物を得ることができる。

次に、式の化合物が優れた抗アレルギー作用、抗炎症作用を有することについて実験例を挙げて説明する。

実験例1

RBL1培養細胞を 5×10^6 細胞/mlとなるように1mM エチレンジアミン四酢酸(EDTA)および10% エチレンジグリコールを含む50mM リン酸緩衝液(pH7.4)に浮遊し、超音波処理後、 $10,000 \times G$ で10分間、さらに $105,000 \times G$ で60分間遠心分離した上清を5-リボキシゲナーゼ酵素標品とした。

基質として、 $10 \mu M$ アラキドン酸、上記のように調製して得た酵素標品および具体例で得た化合物のアセトン溶液を種々の濃度となるように試験管により、37℃で10分間反応させた。内部標準として0.25Mのブチレ 3,5-ジニトロベンゾエート

-3-

10 μ lを添加し、ヘキサン 1.8mlで抽出した。この中の5-HETEの量を高速液体クロマトグラフィー[カラム, TSKgel ODS-80TM, TOYO SODA] 移動相, テトラヒドロフラン:アセトニトリル(1%酢酸)=5:5:9 流速, 1ml/分; 検出, 紫外線 235nm.]により測定した。

この結果から、5-リボキシゲナーゼ阻害率を次式により算出した。

$$\text{阻害率} = \frac{C-S}{C} \times 100 (\%)$$

C: 具体例で得た化合物を含まない場合の

5-HETEのピーク面積

(内部標準により補正)

S: 具体例で得た化合物を添加した場合の

5-HETEのピーク面積

(内部標準により補正)

-4-

具体例で得た化合物の $10 \mu M$ での5-リボキシゲナーゼ阻害率および50%阻害濃度(IC₅₀)を第1表に示す。

第1表

	阻害率 ($10 \mu M$)	IC ₅₀ (M)
具体例1で得た化合物	—	3.4×10^{-7}
具体例2で得た化合物	44.9%	—
具体例3で得た化合物	47.6%	—

以上の結果より式の化合物が5-リボキシゲナーゼ阻害作用を有することが確認された。

実験例2

具体例1で得た化合物をオリーブ油に溶解して濃度2mg/mlの薬物を調製し、この薬物0.2mlをバルブ/c系マウス(雄性、7週齢)に経口投与し、投与1時間後に、調製後1時間~24時間経過したカラゲラン(carragenin: 1%)を含有する生理的食塩水

溶液 0.05ml をマウスの足趾に注射し、反応を惹起した。反応惹起1時間後、3時間後および5時間後の足浮腫(マウスの足の容積)を測定し、前値(カラゲニン投与前のマウスの足の容積)を引いて強度を求めた。またコントロール群にはオリーブ油のみを 0.2ml 経口投与し、同様に測定した。その結果を第2表に示す。

第2表

	1時間後	3時間後	5時間後
コントロール	5.86 μ l	65.57 μ l	80.31 μ l
具体例1で得た化合物	0 μ l	23.31 μ l	46.0 μ l

実験例3

羊の赤血球(SRBC; Seep Red Blood Cell) 5×10^6 個を含有する生理的食塩水 0.2ml をバルブ/c系マウス(雌性、7週齢)尾静脈内投与し免疫した。尾静脈内投与より3日後に足の前値(容積)を測定した。免疫日から4日後に SRBC 1×10^8 個を含有す

-7-

尾静脈内に投与し免疫した。このマウスに具体例1で得た化合物をオリーブ油に溶解した濃度 10mg/ml の薬物 0.2ml/回を免疫日から3日間(4回)経口投与した。

SRBC 免疫4日後、マウスを脱血屠殺した後、脾臓を摘出した。脾臓をつぶし、金属メッシュ(200mesh)に通し、単細胞(single cell)にした。溶血斑形成細胞検定(PFC assay)用 SRBC は免疫に用いた SRBC と同じロット(lot)のものを確保し、生理食塩水に SRBC を 4×10^8 /ml になるように調製し、希釈細胞浮遊液 0.1ml と [SRBC+補体(モルモノト血清)(1:1)] 0.25 μ l を加えてよく混和し、その後、カーニングムチンチューブに 0.1ml 流し込み、パラフィン(ワセリン)1:1 で封入した。

37°C で1時間インキュベーション後、脾臓細胞 10^6 個中の溶血斑(plaque)形成細胞数を数えて測定した。その結果を第4表に示す。

る生理的食塩水 25 μ l をマウス足趾に皮下投与して反応誘発した。反応惹起時と反応惹起から16時間後の2回、具体例1で得た化合物をオリーブ油に溶解した薬物(濃度 10mg/ml) 0.2ml/回を経口投与し、反応惹起から24時間後に足の浮腫を測定し、反応24時間後の値と前値の差から強度を求めた。その結果を第3表に示す。

またコントロール群にはオリーブ油のみを 0.2ml 経口投与し、同様に測定した。その結果を第3表に示す。

第3表

	強度(μ l)
コントロール	16.17
具体例1で得た化合物	1.36

実験例4

洗浄 SRBC 5×10^6 個/ml を含有する生理的食塩水溶液 0.2ml をバルブ/c系マウス(雌性、7週齢)

-8-

第4表

	溶血斑形成細胞数(個)
コントロール	1974
具体例1で得た化合物	1602

次に、式の化合物の急性毒性試験を ICR 系雄性マウスを用いて行ったところ、1g/kg の経口投与で死亡例はなかった。

次に、式の化合物の投与量および製剤化について説明する。

式の化合物はそのまま、あるいは慣用の製剤担体と共に動物および人に投与することができる。投与形態としては、特に限定がなく、必要に応じ適宜選択して使用され、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤等の経口剤、注射剤、坐剤等の非経口剤が挙げられる。

経口剤として早期の効果を発揮するためには、患者の年齢、体重、疾患の程度により異なるが、

通常成人で式の化合物の重量として50mg~5gを、1日数回に分けての服用が適当と思われる。

経口剤は、例えばゲンブレン、乳糖、白糖、マンニト、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類等を用いて常法に従って製造される。

この種の製剤には、適宜前記賦形剤の他に、結合剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤、着色剤、香料等を使用することができる。それぞれの具体例は以下に示すごとくである。

〔結合剤〕

ゲンブレン、デキストリン、アラビアゴム末、ゼラチン、ヒドロキシプロピルスターチ、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、結晶セルロース、エチルセルロース、ゼラチンクロリド、マシコゴール。

〔崩壊剤〕

ゲンブレン、ヒドロキシプロピルスターチ、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、カルボキシメチルセルロース、低置換ヒドロキシプロピルセルロース。

〔界面活性剤〕

ラウリル硫酸ナトリウム、大豆レシチン、ショ糖脂肪酸エステル、ポリカルベート 80。

〔滑沢剤〕

タルク、コウ類、水素添加植物油、ショ糖脂肪酸エステル、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸アルミニウム、ポリエチレングリコール。

〔流動性促進剤〕

経質無水ケイ酸、乾燥水酸化アルミニウムゲル、合成ケイ酸アルミニウム、ケイ酸マグネシウム。

-11-

また、式の化合物は、懸濁液、エマルジョン、シロップ剤、ミニキシル剤としても投与することができ、これらの各種剤形には、矯味矯臭剤、着色剤を含有してもよい。

非経口剤として肝期の効果を發揮するためには、患者の年齢、体重、疾患の程度により異なるが、通常成人で式の化合物の重量として1日0.1mg~1gまでの静注、点滴静注、皮下注射、筋肉注射が適当と思われる。

この非経口剤は常法に従って製造され、希釈剤として一般に注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖水溶液、注射用植物油、ゴマ油、オリーブオイル、ダイズ油、オウモロコシ油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等を用いることができる。さらに必要に応じて、殺菌剤、防腐剤、安定剤、乳化剤を加えてもよい。

また、この非経口剤は安定性の点から、バイアル等に充填後冷凍し、通常の凍結乾燥技術により乾分を除去し、使用直前に凍結乾燥物から復元す

-12-

再調製することもできる。さらに、必要に応じて適宜、等張化剤、安定剤、防腐剤、無痛化剤等を加えてもよい。

その他の非経口剤としては、外用液剤、軟膏等の塗布剤、直腸内投与のための坐剤等が挙げられ、常法に従って製造される。

次に、式の化合物を製造する具体例を以下に示す。

具体例1

粉碎した生薬薺北 2kg をヘキサン 42l で抽出し、得られた抽出液より溶媒を除去してヘキサンエキスを75gを得た。このヘキサンエキスをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン/ジエチルエーテル = 10:0, 7:3, 0:10 で順に溶出し、それぞれの画分A、画分B、画分Cを得た。

画分Aをメタノールから再結晶を繰り返し、淡黄色針状晶 1.9gを得た。この淡黄色針状晶は、文獻 [Itiro Yosioka, Shintaro Takahashi, Hiroshi Hikino and Yasuko Sasaki, YAKUGAKU

ZASSHI, 80, 1564 (1960); Ituro Yosioka, Hiroshi Hikino and Yasuko Sasaki, Chem. Pharm. Bull., 8, 949 (1960); ibid., 8, 952 (1960); ibid., 8, 957 (1960); Yoichi Nishikawa, Ichiro Yasuda, Yohya Watanabe and Takako Seto, YAKUGAKU ZASSHI, 96, 1322 (1976) に記載のアトラクチロジン(atractylodin)と理化学的性質が一致することから、式I中のRが酸素原子である 2-[(1E,7E)-1,7-ノナジエン-3,5-ジイニール]フランであると決定した。

具体例2

具体例1で得た画分Bをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、クロロホルムで700mlから1100mlまで溶出する画分を再びシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン:クロロホルム = 10:0、6:4、0:10で順に溶出し、ヘキサン:クロロホルム = 6:4で溶出した画分をヘキサン:ジエチルエーテルから再結晶し、淡黄色針状晶 94mgを得た。この淡黄色針状晶は、文献[Yoichi

Nishikawa, Ichiro Yasuda, Yohya Watanabe and Takako Seto, YAKUGAKU ZASSHI, 96, 1322 (1976) に記載のアセチラトラクチロジノール(acetyltractylodinol)と理化学的性質が一致することから、式中Rがアセトキシル基である 2-[(1E,7E)-9-アセトキシル-1,7-ノナジエン-3,5-ジイニール]フランであると決定した。

具体例3

具体例1で得た画分Cをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン:ジエチルエーテル = 55:45で溶出した画分をヘキサン:ジエチルエーテルから再結晶を繰り返して、淡黄色針状晶 89mgを得た。この淡黄色針状晶は、文献[Yoichi Nishikawa, Ichiro Yasuda, Yohya Watanabe and Takako Seto, YAKUGAKU ZASSHI, 96, 1322 (1976) に記載のアトラクチロジノール(atractylodinol)と理化学的性質が一致することから、式中Rが水酸基である (2E,8E)-9-(2-フリル)-

15

2,8-ノナジエン-4,6-ジイン-1-オールであると決定した。

次に、製剤例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれにより何等制限されるものではない。

[製剤例1]

I コーンスターチ	44g
II 結晶セルロース	40g
III カルボキシメチルセルロースカルシウム	5g
④ 軽質無水ケイ酸	0.5g
⑤ ステアリン酸マグネシウム	0.5g
⑥ 具体例1で得られた化合物	10g
計	100g

上記の処方に従ってI~IIIを均一に混合し、打錠機にて圧縮成型して一錠200mgの錠剤を得た。

この錠剤一錠には、具体例1で得られた化合物 20mgが含有されており、成人1日3~10錠を数回にわけて服用する。

16

[製剤例2]

① 結晶セルロース	84.5g
② ステアリン酸マグネシウム	0.5g
③ カルボキシメチルセルロースカルシウム	5g
④ 具体例2で得られた化合物	10g
計	100g

上記の処方に従って①、④および②の一部を均一に混合し、圧縮成型した後、粉碎し、③および②の残量を加えて混合し、打錠機にて圧縮成型して一錠200mgの錠剤を得た。

この錠剤一錠には、具体例2で得られた化合物 20mgが含有されており、成人1日3~10錠を数回にわけて服用する。

[製剤例3]

①結晶セルロース	34.5g
②10%ヒドロキシプロピルセルロースエタノール溶液	50g
③カルボキシメチルセルロースカルシウム	5g
④ステアリン酸マグネシウム	0.5g
⑤具体例3で得られた化合物	10g
計	100g

上記の処方に従って①、②および③を均一に混合し、常法によりねつ和し、押し出し造粒機により造粒し、乾燥・解砕した後、④および⑤を混合し、打錠機にて圧縮成型して一錠200mgの錠剤を得た。

この錠剤一錠には、具体例3で得られた化合物20mgが含有されており、成人1日3~10錠を数回にわけて服用する。

-19-

[製剤例5]

①結晶セルロース	55g
②10%ヒドロキシプロピルセルロースエタノール溶液	35g
③具体例1で得られた化合物	10g
計	100g

上記の処方に従って①~③を均一に混合し、ねつ和した。押し出し造粒機により造粒後、乾燥し、篩別して顆粒剤を得た。

この顆粒剤1gには、具体例1で得られた化合物100mgが含有されており、成人1日0.6~2gを数回にわけて服用する。

[製剤例6]

①コーンスターチ	59.5g
②軽質無水ケイ酸	0.5g
③具体例3で得られた化合物	10g
計	100g

上記の処方に従って①~③を均一に混合し、200mgを2号カプセルに充填した。

[製剤例4]

①コーンスターチ	84g
②ステアリン酸マグネシウム	0.5g
③カルボキシメチルセルロースカルシウム	5g
④軽質無水ケイ酸	0.5g
⑤具体例2で得られた化合物	10g
計	100g

上記の処方に従って①~⑤を均一に混合し、圧縮成型機にて圧縮成型後、破砕機により粉砕し、篩別して顆粒剤を得た。

この顆粒剤1gには、具体例2で得られた化合物100mgが含有されており、成人1日0.6~2gを数回にわけて服用する。

-20-

このカプセル剤1カプセルには、具体例3で得られた化合物20mgが含有されており、成人1日3~10カプセルを数回にわけて服用する。

[製剤例7]

①注射用蒸留水	59.5g
②大豆油	5g
③大豆リン脂質	2.5g
④グリセリン	2g
⑤具体例1で得た化合物	1g
全量	100g

上記の処方に従って⑤を②および③に溶解し、これに①と④の溶液を加えて乳化し、注射剤を得た。

JAPANESE PATENT OFFICE
PATENT GAZETTE

ANTI-INFLAMMATORY AND ANTI-ALLERGIC AGENTS

Patent Publication No.: Hei 4-208222

DATE OF Publication: July 29, 1992

Patent Application No.: Hei 2-330524

Date of Application: November 30, 1990

Inventors: Kaoru Nakajima, Tsumura Kabushiki Kaisha, Yoshihara 3586, Ami-cho, Inagaki-gun, Ibaraki Prefecture

Toshihiko Yanazawa, Tsumura Kabushiki Kaisha, Yoshihara 3586, Ami-cho, Inagaki-gun, Ibaraki Prefecture

Fumio Iimura, Tsumura Kabushiki Kaisha, Yoshihara 3586, Ami-cho, Inagaki-gun, Ibaraki Prefecture

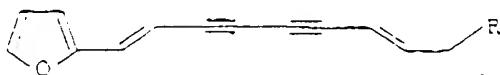
Hiroshi Mihashi, Tsumura kabushiki Kaisha, Yoshihara 3586, Ami-cho, Inagaki-gun, Ibaraki Prefecture

Assignee: Tsumura Kabushiki Kaisha, #4-10 Nihonbashi 3 Chome, Chuo-ku, Tokyo

1. Title of the Invention: Anti-inflammatory and anti-allergic agents

2. Claim

The anti-inflammatory and anti-allergic agents with the polyacetylene of the following formula

coxylic  (where R is a hydrogen atom, hydroxyl or acetoxylic group) as the effective ingredient.

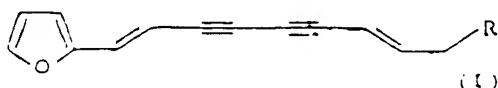
(1)

3. Details of the Invention

This invention is about the anti-inflammatory and anti-allergic agents with polyacetylenes as the effective ingredient.

Previous technics and problems: Lately, with the environmental problems and changes in environments in Japan the number of patients suffering asthma, bronchitis and allergies has been increasing, posing a big social problem. There is demand for the development of anti-allergic agents. At the same time there is also demand for the development of anti-inflammatory agents.

Means to solve the problems: The inventors made lots of efforts to look for compounds which are anti-inflammatory and anti-allergic effective for the treatments of allergies and found such effects in polyacetylenes contained in Atractylodes lancea De Candolle, a medicinal plant, and the plants belonging to the same genus and thus reached this invention. The invention is therefore as follows: The anti-inflammatory and anti-allergic



The compound can be obtained, for example, by the following method.

The said medicinal plant is extracted with at least one of the following solvents, hexane, diethylether, petroleum ether, ethylacetate, chloroform, acetone, methanol or ethanol. The solvent is removed from the resultant extract and the residue is run through a column chromatography, thin layer chromatography or HPLC with porous polymers like Dialon HP-20, and MCI Gel CHP20P, starch gel like Sephadex LH-20, reverse phase silica gel, silical gel, polyamide or cellulose, etc. as carrier and with at least one of the solvents selected from hexane, benzene, diethylether, petroleum ether, ethylacetate, chloroform, acetone, tetrahydrofuran, acetonitrile, methanol, ethanol and water as the eluent once or several times to get the said compound(s).

Next, examples will be given to illustrate the excellent anti-allergic and anti-inflammatory effects of the compound(s).

Example 1:

RBL1 cultured cells were suspended in 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) and 10% ethylene glycol to 5×10^6 cells/ml. After ultrasonication it was centrifuged at 10,000xG for 10 minutes, then at 105,000xG for 60 minutes. The resultant supernate was used as the 5-lipoxygenase sample.

As substrate 10 μ M arachidonic acid, enzyme samples, prepared as described above, and the acetone solution of the compound diluted to different concentrations were put into test tubes and the reaction was allowed to carry out at 37 °C for 10 minutes. As the internal standard 10 μ L of 0.25M butyl-3,5-dinitrobenzoate was added and the extraction was done with 1.6 ml of hexane. Amount of 5-HETE was determined by HPLC [column, TSK gel CDS-80 TM (Toyo Soda Kabushiki Kaisha); mobile phase, tetrahydrofuran/aceonitrile/1% acetic acid = 5/5/9; flowrate, 1 ml/min.; detection by UV (235 nm)]. Inhibition of 5-polyoxxygenase was calculated from the following formula:

Inhibition (%) = $\frac{C \cdot S}{C}$ x 100 (%), where C= peak area of 5-HETE when the sample does not contain the compound in the example (correction made with internal standard); S= peak area of 5-HETE when the compound is added (corrected with internal standard).

Table 1 shows the concentration of 50% inhibition (IC_{50}) and the inhibition of 5-lipoxygenase of the compound at 10 μ M.

Table 1

	% Inhibition (10 μ M)	IC ₅₀ (M)
Compound from Example 1	----	3.4×10^{-7}
Compound from Example 2	44.9	---
Compound from Example 3	47.6	---

From these results it was verified that the compound could inhibit 5-lipoxygenase.

Example 2:

Compound from Example 1 was dissolved in olive oil to prepare a solution of 2 mg/ml. Two-tenth ml of this solution was orally administered to Balb/c mice (female, 7 weeks old). One hour after administration 0.05 ml of the saline solution containing one % of carragenin which had been prepared for 1-24 hours was injected to the tarsus of the mouse to induce the reaction. One, three and five hours after induction of the reaction swelling of the legs (the volume of the mouse) was measured and intensity of the reaction was determined by subtracting the volume of the mouse leg (the volume before the administration of carragenin). Also, to the control group only 0.2 ml of olive oil was given and measurement was done. Results are shown in Table 2.

Table 2

	After 1 hr	After 3 hr	After 5 hr
Control	5.86 μ l	65.57 μ l	80.31 μ l
Compound from Example 1	0 μ l	23.31 μ l	46.0 μ l

Example 3:

Two-tenth ml of physiological saline containing 5×10^5 sheep red blood cells (SRBC) was injected into the caudal vein of the Balb c mice (female, 7 weeks old). Three days after the injection volume of the legs was measured. Four days after the immunization 25 μ l of the physiological saline containing 1×10^8 SRBC was injected hypodermally to the foot pad of the mouse for the induction of the reaction. At the time of the induction and 16 hours after the induction 0.2 ml of olive oil containing 10 mg/ml of the compound obtained from Example 1 was given orally. Swelling of the legs was determined 24 hours after the induction and intensity of the reaction was determined by subtracting the figure obtained before the induction from that 24 hours after the induction. Results are shown in Table 3. Also, to the control group only 0.2 ml of olive oil was given orally and the same deter-

Table 3

	Intensity (ul)
Control	16.17
Compound from Example 1	1.36

Example 4:

Two-tenth ml of the physiological saline containing the washed 5×10^8 SRBC was injected into the caudal vein of the Balb/c mice (female, 7 weeks old) for immunization. To these mice were given orally 0.2 ml of the olive oil containing 10 mg/ml of the compound obtained from Example 1 for three days (total of four times) starting from the day of immunization. Four days after the immunization the mice were sacrificed by bleeding and spleen was removed. The spleen was ground, passed through a 200 mesh sieve to get single cells. For the hemolysis plaque forming cell assay (PFC assay) the SRBC used was the same lot as that used in immunization. SRBC was suspended in the physiological saline to 4×10^9 cell/ml. One-tenth ml of the diluted cell suspension and [SRBC + complement (guinea pig serum) (1:1)] (0.25 ul) were mixed thoroughly, then 0.1 ml was poured into a Cunningham chamber and sealed with paraffin/vaseline (1:1). After incubation at 37 °C for an hour number of the hemolysis plaque forming cells was counted. Results are shown in Table 4.

Table 4

	Hemolysis plaque forming units
Control	1974
Compound from Example 1	1602

Next, the acute toxicity test of the compounds was done with ICR male mice. No fatality was observed under 1 gm/Kg oral administration.

Next, explanation will be given on the dose of the compound and its formulation.

The compound can be used as such or formulated with the conventional carrier(s) and given to man or animals. The form can be any, depending on the situations. Tablets, capsules, granules, dispersion, powder, etc. for oral use, or suppository or injectable, or non-oral uses are possible.

For effective oral administration it depends on the age, body weight and the extent of

Oral drugs can be prepared by formulating with, for example, starch, lactose, sucrose, mannitol, carboxymethylcellulose, corn starch or inorganic salt(s), etc. For this purpose beside the said suitable excipients, binders, lubricants, surfactants, disintegrating agent, coloring agent, fragrance, fluidity promoting agent and seasoning materials, etc. can be added. Examples will be given below.

Binders: Starch, dextrin, gum arabic powder, gelatin, hydroxypropyl starch, methylcellulose, sodium carboxymethylcellulose, hydroxypropylcellulose, crystalline cellulose, ethyl cellulose, polyvinylpyrrolidone, macrogol.

Disintegraders: Starch, hydroxypropyl starch, sodium carboxymethylcellulose, calcium carboxymethylcellulose, carboxymethylcellulose, less-substituted hydroxypropyl cellulose.

Surfactants: Sodium laurylsulfate, soybean lecithin, sucrose fatty acid esters, polysorbate 80.

Lubricants: Talc, waxes, hydrogenated vegetable oils, sucrose fatty acid esters, magnesium stearate, calcium stearate, aluminum stearate, polyethylene glycol.

Fluidity promoters: Light weight anhydrous silicic acid, dried aluminum hydroxide gel, synthetic aluminum silicate, magnesium silicate.

Also, the compound can be formulated to a suspension, emulsion, syrup or elixer. Coloring agent, seasoning or deodorant, etc. can be added.

For the drug to exert its effects as a non-oral agent the dose depends on the age, body weight and the level of the disease of a patient, but usually for an adult 0.1 mg to 1 mg (as the compound) can be given for intravenous injection, hypodermal or intramuscular injection. This non-oral drug is prepared by the ordinary procedures. As diluent usually sterile injectable distilled water, physiological saline, aqueous glucose solution, injection grade vegetable oil, sesame oil, peanut oil, polyethylene glycol, etc. can be used. Also, if necessary, stabilizing agent, emulsifying agent, antiseptic or antimicrobial agent, etc. can be added.

For the stability of this non-oral drug it can be filled into a vial, frozen and water removed by the ordinary lyophilization and just before use it can be restored to solution. Also, if necessary, isotonic agent, stabilizer, antiseptic, or anesthetics, etc. can be added.

Other non-oral drugs can be ointment and liquids for topical applications, and suppository for rectal applications, etc. These can be prepared by the ordinary procedures.

Next, examples will be shown to prepare the compounds.

Example 1:

Two Kg of pulverized Attractylodes lancea was extracted with 42 l of hexane. The solvent was removed from the extract which gave 75 gm of the extract. This hexane extract was run through a silica gel column chromatography with hexane/diethyl ether (10/0, 7/3 and 0/10, as the eluant in that order to get fractions A, B and C.

Recrystallization was repeated of the fraction A with methanol which gave 1.9 gm of light yellow needles. As this light yellow needles agreed with the physico-chemical properties of attractylodin described in Yakugaku Zasshi 80: 1564 (1960) by Itiro Yosioka, Shintaro Takahashi, Hiroshi Hikino and Yasuko Sasaki; Chem. Pharm. Bull 8: 949 (1960) by Itiro Yosioka, Hiroshi Hikino and Yasuko Sasaki; Ibid. 8: 952 (1960); Ibid. 8: 957 (1960) and Yakugaku Zasshi 96: 1322 (1976) by Yoichi Nishikawa, Ichiro Yasuda, Yohya Watanabe and Takako Seto, it was concluded that it was 2-[(1E,7E)-1,7-nonadiene-3,5-dienyl]furan where R in the formula was a hydrogen atom.

Example 2:

Fraction B from Example 1 was run through a silica gel chromatography and the fraction eluted from 700 ml to 1,100 ml chloroform was run again through the silica gel column chromatography in the order of hexane/chloroform=10/0, 6/4 and 0/10. The fraction eluted by hexane/chloroform=6/4 was recrystallized from hexane-diethylether which gave 94 mg of light yellow needles. These light yellow needles agreed with the physico-chemical properties of acetyl attractylodinol described in Yakugaku Zasshi 96: 1322 by Nishikawa, Ichiro Yasuda, Yohya Watanabe and Takako Seto so it was identified as 2-[(1E,7E)-9-acetoxyl-1,7-nonadiene-3,5-dienyl]furan.

Example 3:

The fraction C obtained from Example 1 was run through a silica gel column chromatography and the fraction eluted with hexane/diethylether=55/45 was recrystallized repeatedly with hexane-diethylether which gave 89 mg of light yellow needles. These light yellow needles agreed in physico-chemical properties of attractylodinol described in Yakugaku Zasshi 96:

1322 (1976) by Yoichi Nishikawa, Ichiro Yasuda, Yohya Watanabe and Takako Seto so it was identified as (2E,8E)-9-(2-furyl)-2,8-nondiene-4,6-diene-1-ol wherein R in the formula was a hydroxyl group.

Next, examples will be given for the preparation of the drugs to explain the invention more in detail, but the invention is not limited to these examples.

Drug preparation 1:

Formulation: Corn starch--- 44 gm, crystalline cellulose---40 gm, calcium carboxymethylcellulose--- 5 gm, light weight anhydrous silicic acid--- 0.5 gm, magnesium stearate--- 0.5 gm and the compound obtained from Example 1 --- 10 gm (Total, 100 gm).

The first six ingredients were mixed to homogeneity and using the tablet puncher it was compression-molded to make tablets of 200 mg/tablet. Each tablet contained 20 mg of the compound from Example 1. Three-10 tablets are used per day by an adult in several occasions.

Drug preparation 2:

Crystalline cellulose ----- 34.5 gm; magnesium stearate ----- 0.5 gm; calcium carboxymethylcellulose ----- 5 gm and the compound from from Example 2 ----- 10 gm (total, 100 gm)..

Crystalline cellulose, the compound and part of magnesium stearate were mixed to homogeneity, compression-molded and then pulverized. Calcium carboxymethylcellulose and the remaining magnesium stearate were added, mixed thoroughly, compression-molded with a tablet puncher to make tablets of 200 mg each. This tablet contained 20 mg of the compound obtained from Example 2. An adult can take 3-10 tablets per days in several occasions.

Drug preparation 3:

Crystalline cellulose ----- 34.5 gm; 10% ethanol solution of hydroxypropyl cellulose ----- 50 gm; calcium carboxymethylcellulose ----- 5 gm; magnesium stearate ----- 0.5 gm and the compound obtained in Example 3 ----- 10 gm (total, 100 gm).

Crystalline cellulose, the ethanol solution of hydroxypropyl cellulose and magnesium stearate were blended thoroughly, kneaded by the ordinary procedure and maded into granules

with an extrusion-pelletizer. The granules were dried and pulverized. Calcium carboxymethyl cellulose and magnesium stearate were added and the mixture was compression-molded with a tablet puncher to make tablets of 200 mg each. Each tablet contained 20 mg of the compound of Example 3. An adult takes 3-10 tablets per day in several occasions.

Drug preparation 4:

Corn starch ----- 84 gm; magnesium stearate ----- 0.5 gm; calcium carboxymethylcellulose ----- 5 gm; light weight anhydrous silicic acid ----- 0.5 gm, and the compound from Example 2 ----- 10 gm (total, 100 gm).

All the ingredients were mixed to homogeneity and after compression molding with a compression molder it was pulverized in a pulverizer, sieved to make granules. One gm of the granules contained 100 mg of the compound from Example 2. An adult can take 0.6-2 gm a day in several occasions.

Drug preparation 5:

Crystalline cellulose ----- 55 gm, 10% ethanol solution hydroxypropyl cellulose ----- 35 gm; and the compound from Example 1 ----- 10 gm (total, 100 gm).

These three ingredients were mixed thoroughly and kneaded. After granulation in an extrusion pelletizer, desiccation and sieving, pellets were obtained. One gm of these pellets contained 100 mg of the compound from Example 1. An adult can take 0.6-2 gm a day in several occasions.

Drug preparation 6:

Corn starch ----- 89.5 gm; light weight anhydrous silicic acid ----- 0.5 gm; and the compound from Example 3 ----- 10 gm (total, 100 gm).

The three ingredients were mixed thoroughly and 200 mg was used to make each capsule in a No. 2 capsule. One gm of this capsule contained 20 mg of the compound from Example 3. An adult can take 3-10 capsules a day in several occasions.

Drug preparation 7:

Injection grade distilled water ----- 89.5 gm; soybean oil ----- 5 gm; soybean phospholipids ----- 2.5 gm; glycerol ----- 2 gm; and the compound from Example 1 ----- 1 gm (total, 100 gm).

The compound was first dissolved in soybean oil and soybean phospholipids. Injection grade distilled water and glycerol were then added to prepare the injectable.